

REC'D 25 MAR 2003

WIPO

PCT

P/KR 03/00455
Rec'd PCT/PTO 07 SEP 2004
RO/KR 08.03.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

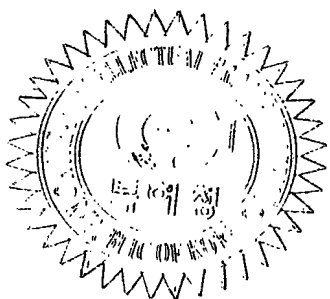
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0015217
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 03월 21일
Date of Application
MAR 21, 2002

출원 인 : 김경진
Applicant(s) Kim Kyung Jin

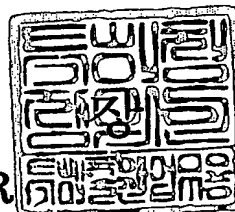
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 03 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2002.03.21
【발명의 명칭】	캐스페이즈 활성 평가 방법
【발명의 영문명칭】	Caspase Assay System
【출원인】	
【성명】	김경진
【출원인코드】	4-2002-009332-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최 영식
【성명의 영문표기】	CHOE, Youngshik
【주민등록번호】	710216-1830010
【우편번호】	431-839
【주소】	경기도 안양시 동안구 호계1동 956-4
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박 재용
【성명의 영문표기】	PARK, Jae-Yong
【주민등록번호】	680415-1056218
【우편번호】	150-043
【주소】	서울특별시 영등포구 당산동3가 평화아파트 C-321
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신 동승
【성명의 영문표기】	SEEN, Dongseung
【주민등록번호】	680930-1168211
【우편번호】	151-782
【주소】	서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 108-2104
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정 연철
 【성명의 영문표기】 JUNG, Neon C.
 【주민등록번호】 701225-1674616
 【우편번호】 151-774
 【주소】 서울특별시 관악구 봉천5동 삼성아파트 133-1801
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김 경진
 【성명의 영문표기】 KIM, Kyung Jin
 【주민등록번호】 520101-1024511
 【우편번호】 120-757
 【주소】 서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104-1102
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 1
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 출원인 김경진 (인)

【수수료】

【기본출원료】	12 면	29,000 원
【가산출원료】	0 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	4 항	237,000 원
【합계】		266,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】		79,800 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 caspase의 활성을 측정할 수 있는 assay system에 관한 것으로서 삽입형 형광단백질(InsYFP)의 변종인 peridot 내부에 caspase-2/3/7 substrate의 인지 아미노산 서열인 DEVD를 삽입하여 caspase-2/3/7 효소의 활성화에 의해 형광이 변화하는 재조합 형광 단백질을 제조하였고 이를 데브딘스(DEVDins)라 명명하였다. 제조된 바이오센서인 데브딘스를 CHO-K1 세포주에 도입하고 이를 발현하는 세포주를 선별한 다음 세포사 유도 물질인 okadaic acid를 20 mM/ml 농도로 처리한 후 시간 별로 형광 현미경에서 이미지를 분석하였고 공초점현미경하에서 그 형광의 세기를 정량하였다. 그 결과 caspase의 활성의 변화를 보여주는 바이오센서 분자를 발명하게 되었고, 이 바이오센서를 세포주에 도입함으로써 caspase assay를 수행할 수 있는 cell based assay system을 확립하였다. 또한 이를 이용한 유전자 도입형 동물을 이용한 caspase assay의 모델 동물 개발의 길을 열어놓았다 하겠다.

【대표도】

도 1

【색인어】

캐스페이즈(Caspase), 삽입형 형광단백질(Inserted YFP), 데브딘스(DEVDins), 약물검색, 세포사, 세포수준약효검색(cell based assay), HTS(High throughput system)

【명세서】

【발명의 명칭】

캐스페이즈 활성 평가 방법 {Caspase Assay System}

【도면의 간단한 설명】

도1. CHO-K1-DEVDins에 세포사 유도물질인 okadaic acid를 20 mM/ml의 농도로 처리한 후 시간 별로 형광 현미경에서 얻은 형광이미지

도2. 도1의 형광이미지를 공초점현미경 하에서 정량화한 그림

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 다세포 생물에서 유전자 발현에 의한 세포사 (programmed cell death)는 발생과 항상성 유지를 위해서 필수적인 과정이다. 이 과정에서 세포는 유전자의 조각화, 세포질의 파동, 세포의 수축이 일어나 세포질에 쌓여 작은 포낭 형태로 식세포 활동에 의해서 제거 된다. 따라서, 세포 괴사와 달리 염증 반응을 일으키지 않음으로 정상 발생에 중요한 기능을 수행하게 된다. 그러나, 과도한 세포의 죽음은 허혈에 의한 조직 손상 및 퇴행성 뇌질환을 일으키며, 유전자에 의한 세포사가 제대로 수행되지 못할 때 암이나 자가면역에 의한 질환이 발생할 수 있다 (Raff M, Cell suicide for beginners. Nature 1998, 396:119-122; Jacobson MD, Weil M, Raff MC, Programmed cell death in animal development. Cell 1997, 88:347-354). 최근의 연구에 의해, 이러한 세포사의 조절의 분

자적 메커니즘이 알려지고 있으며 특히, 시스테인 단백질분해효소인 caspase가 여러단계의 세포사 과정에 필수적인 역할을 수행한다는 사실을 알게 되었다 (Wolf BB, Green DR, Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. J Biol Chem 1999, 274: 20049-20052). 세포사는 다양한 단백질의 활성이 순차적으로 일어나면서 하위 단계의 효소를 활성화 하는 계단식 정보전달에 기반한다. 예를 들어, 면역계의 발생이나 발생중 바이러스의 감염에 의해 암괴사인자(tumor necrosis factor)와 같은 세포사를 일으키는 리간드가 수용체에 붙게 되면 세포내로 세포사를 일으키는 명령이 전달되는데, 이 때, caspase-8/10이 수용체의 신호를 전달 받게 된다. 세포내의 스트레스에 의해 미토콘드리아에서 cytochrome C가 분비되면 caspase-9를 활성화하게 되고 하위 단계의 caspase를 활성화 하게 된다. 이러한 하위 단계의 caspase는 유전자 복구, 세포주기 조절, 세포사 억제 등의 기능을 담당하는 단백질을 변화시키거나 제거함으로써 세포사를 직접 유도하게 된다 (Green DR, Apoptotic pathways: the roads to ruin. Cell 1998, 94:695-698; Ashkenazi A, Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation. Science 1998, 281:1305-1308; Green DR, Reed JC, Mitochondria and apoptosis. Science 1998, 281:1309-1312).

<4> Caspase는 아스파르트산 다음의 아미노산 배열을 인식해서 단백질을 절단하게 되는데, 단백질 억제자를 이용한 실험에서 caspase-1, 4, 5, 13 등은 WEHD를 caspase-2, 3, 7은 DEXD를, 그리고 caspase-6, 8, 9, 10은 I(/V/L)EXD를 인지하여 효소활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 특히, 잘 알려져 있는 기질 단백질인 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)는 115 kDa의 핵단백질로서 DNA strand에 생긴 끊김을 인지하여 DNA에 결합하는 것으로 알려져 있다. DNA 끊김은 PARP를 활성화하

여 poly(ADP-ribose)를 만들게 하고 이러한 ADP-ribose 폴리머는 PARP를 비롯한 다양한 단백질을 변화시키게 된다. 그 결과, 염색질해체(chromatin decondensation)를 유도하여 DNA 복구를 돕게 한다 (Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH, Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. Trends Pharmacol Sci 1999, 20:171-181).

그러나, 세포사가 일어날 때 caspase는 PARP를 24 kDa, 89 kDa 두개의 조각으로 자르게 되는데, 이후 연구에서, 이러한 단계는 세포사의 신호가 계단식으로 전달될 때 중요한 표지로 사용되게 되었다 (Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 1994, 371:346-347). 이러한 사실에 기반하여 Xu 등은 녹색 형광 단백질 (green fluorescence protein, GFP)과 파란색 형광 단백질 (blue fluorescence protein, BFP) 사이에 DEVD 아미노산 배열을 위치시켜 발생하는 형광에너지 전이현상(FRET)을 이용하여 caspase-3 (CPP32)의 활성을 측정하였으며 (Xu X, Gerard AL, Huang BC, Anderson DC, Payan DG, Luo Y, Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. Nucleic Acids Res 1998, 26:2034-2035), BD Bioscience Clontech은 nuclear export sequence에 DEVD 아미노산 배열을 위치하여 YFP의 세포내 위치를 통해 caspase-3의 활성을 측정하는 방법을 개발하였다 (BD biosciences clontech, PR1Z499W). 그러나 FRET 현상을 이용하여 caspase 활성을 측정하는 경우에는 신호대 잡음 비율(S/N ratio)이 낮은 문제점이 지적되었고, 세포내 단백질 이동을 이용할 경우에는 이차적인 신호를 거친 결과를 측정함으로써 고가의 장비를 사용하여 할 뿐만 아니라 효소 활성을 수치화하는데 어려움이 있어 왔

다. 따라서, 세포내의 caspase의 활성을 측정할 수 있는 효율적이고 경제적인 방법의 개발에 관한 필요가 대두되었다.

<5> 본 발명에서는 형광단백질 내에 caspase-2/3/7 인식 아미노산 배열을 추가하여 효소활성에 의해서 형광 단백질에서 노출되는 형광의 변화에 효소 활성이 비례하도록 caspase-3 센서를 제작하여 형광 현미경상에서 caspase-3의 활성을 측정하고 그 활성 정도를 수치화하도록 하였다.

<6> 단일 단백질 내에 아미노산 배열을 위치시키기 위해서 Baird 등은 GFP의 Tyr-145번 위치에 외부의 단백질을 삽입하여도 형광에 영향을 주지 않는다는 사실을 보고한 바 있다 (Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY, Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96:11241-11246).

<7> 본 발명에서는 (주)뉴로제넥스에 의해 기출원된 특허 (10-2002-0012409145)에서 보고된 변종 형광단백질로서 기존의 삽입형 형광단백질에 비해 안정적이고 강력한 형광을 발산하는 페리도트(peridot)를 사용하였다. 이는 GFP의 S65G, V68L, Q69M, S72A, 및 T203Y의 다섯 아미노산을 치환하여 만들어진 황색 편이 녹색형광단백질인 시트린(citrine)으로부터 145번 아미노산인 티로신대신에 YGGSGAS의 삽입부위 아미노산 서열을 삽입하고, P192L 변이가 추가된 변종단백질이다. 이러한 사실에 기반하여 페리도트 내부에 DEVD 아미노산 서열을 삽입하고 데브딘스(DEVDins)라 명명하였다. 제조된 DEVDins를 CHO-K1(Chinese hamster ovarian) 세포주에 도입한 후 DEVDins를 발현하는 세포주를 만

들고 이를 CHO-K1-DEVDins라 명명하였다. 이 세포주에 세포사를 유도하는 약물을 처리하고 형광의 강도 변화를 통해서 caspase-2/3/7의 활성을 정량적으로 측정하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<8> 본 발명은 caspase의 활성을 측정할 수있는 biosensor를 개발하는 것으로, 약물 스크린과 같은 고속검색시스템에 적합하고 효소 활성을 정량적으로 분석하기 위해 형질 도입 실험동물에 도입하거나 세포내 targeting이 유용한 biosensor를 개발하고자 하는데에 있다.

<9> 이를 위해 본 발명에서는 내부에 외부 유전자를 삽입할 수있는 형광 강도가 증강된 삽입형광단백질을 이용하고 이의 외부유전자 삽입부위에 caspase의 기질의 절단부위를 도입하였을 때에도 형광의 유지여부를 확인하고자 하였다.

<10> 또한 caspase의 기질의 절단부위 인지서열에 있어서 caspase의 종류에 따라 세가지 인지서열이 알려졌는 바 본 발명에서는 DEVD 인지서열을 이용하여 재조합 삽입형광단백질을 제조하고 이를 세포 내에 도입하여 선별한 후, 세포사를 유도하는 약물을 처리하고 이에 따른 형광 강도의 변화를 통해서 caspase-2/3/7의 활성을 정량적으로 측정할 수 있음을 보이고자하였다.

【발명의 구성 및 작용】

<11> 본 발명은 다음과 같은 구성으로 구성되어있다.

<12> 본 발명은 상기 삽입형 형광단백질(inserted YFP)내에 caspase-1/4/5/13은 WEHD, caspase-2/3/7은 DEXD, caspase-6/8/9/10은 I(/V/L)EXD로 구별되는 caspase 인지 아미노산 서열의 삽입을 그 특징으로하는 재조합 형광단백질을 제공한다.

<13> 또한 본 발명에서 제공하는 재조합 형광단백질을 세포내에 도입함으로써 다양한 세포주를 이용한 세포 수준의 약효 분석에 이용될 수 있음은 당업자에게 있어서 당연한 사실이라 하겠고, 이를 이용한 유전자 도입형 동물의 제작 또한 자명한 사실이라 하겠다.

【발명의 효과】

<14> 본 발명에 따른 재조합 형광단백질은 삽입형광단백질을 단백질 분해효소의 활성 측정 및 정량에 응용하여 실용화한 실례로서 향후 다양한 약물의 스크린과 고속 평가시스템 등 다양한 분야의 연구에 파급효과를 보일 것으로 생각된다. 특히, DEVDins는 세포사유도시 caspase의 활성을 측정하거나, caspase 활성화와 관련된 약물을 스크린, 본 재조합 벡터를 사용한 세포주, 형질전환실험동물 제작하는데 유용하게 사용될 수 있는 biosensor임은 자명하다 하겠다.

<15> 본 발명에서 제공하는 바이오센서를 동물세포내로 도입하여 세포주를 만들어 caspase assay에 사용 할 수 있음은 당업자에게 있어서는 자명한 사실이라 하겠다. 또한 본 발명에서 제공하는 DEVDins를 이용해서 유전자이식 동물을 만들어서 caspase assay가 가능한 실험 질환 모델 동물을 만들 수 있음도 생명공학의 분야에 몸담고 있는 사람들에게는 당연하다고 하겠다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

삽입형 형광단백질을 이용한 caspase assay system

【청구항 2】

청구항1에 있어서 caspase 기질단백질의 절단부위 인지서열의 삽입을 그 특징으로하는
caspase assay system

【청구항 3】

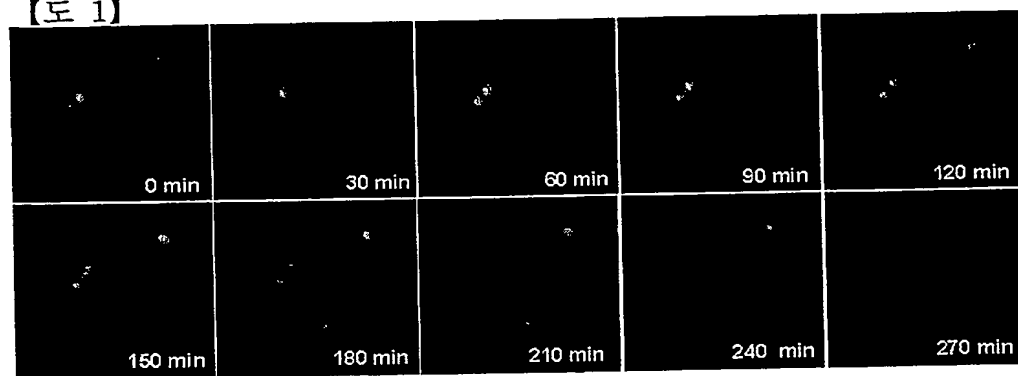
청구항1에 있어서 caspase 기질단백질의 절단부위 인지서열인 DEVD 아미노산 서열이 삽
입된 DEVDins 형광단백질

【청구항 4】

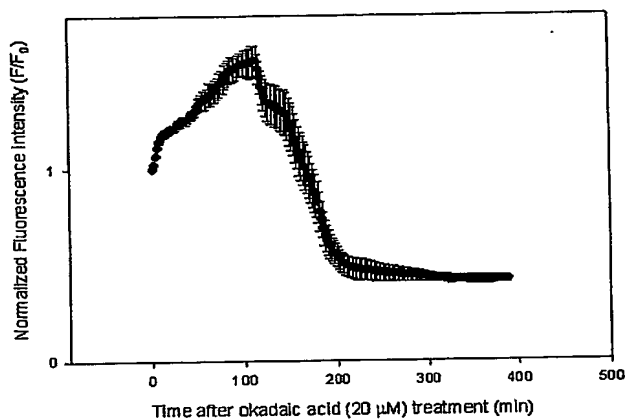
청구항3에 있어서 DEVDins를 코딩하고 있는 염기서열

【도면】

【도 1】

Time after okadaic acid (20 μ M) treatment

【도 2】



【서열목록】

<110> KIM, Kyung Jin <120> Caspase Assay System <160> 1 <170> KopatentIn
 1.71 <210> 1 <211> 795 <212> DNA <213> Homo sapiens & Aequorea victoria
 chimeric protein <220> <221> CDS <222> (1)..(792) <223> peridot containing
 recognition sequence of caspase substrate <400> 1 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg

ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
 Gly Val Val Pro Ile Leu 1 5 10
 15 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc
 96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly 20
 25 30 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg
 aag ttc atc 144 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe
 Ile 35 40 45 tgc acc acc
 ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg act acc 192 Cys Thr Thr Gly Lys
 Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50 55
 60 ttc ggc tac ggc ctg atg tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag
 240 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys 65
 70 75 80 cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc
 gaa ggc tac gtc cag gag 288 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
 Tyr Val Gln Glu 85 90 95
 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336 Arg Thr
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu 100
 105 110 gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc
 gag ctg aag ggc 384 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
 Lys Gly 115 120 125 atc gac
 ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432 Ile Asp Phe Lys
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130 135

출력 일자: 2003/3/14

15-13

Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu 1 5
 10 15 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser
 Gly 20 25 30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35 40
 45 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50
 55 60 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met
 Lys 65 70 75 80 Gln His Asp Phe
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu 85
 90 95 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
 Glu 100 105 110 Val Lys Phe Glu Gly Asp
 Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly 115 120
 125 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130
 135 140 Asn Tyr Gly Gly Ser Ala Ile Lys Asn Glu Gly Lys Arg Lys Gly
 Asp 145 150 155 160 Glu Val Asp Gly
 Thr Asp Glu Val Ala Ala Ser Asn Ser His Asn Val 165
 170 175 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
 Lys 180 185 190 Ile Arg His Asn Ile Glu
 Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr 195 200
 205 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Leu Val Leu Leu Pro Asp Asn 210
 215 220 His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 Lys 225 230 235 240 Arg Asp His Met

20020015217

출력 일자: 2003/3/14

Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr

245

250

255 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

260

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.